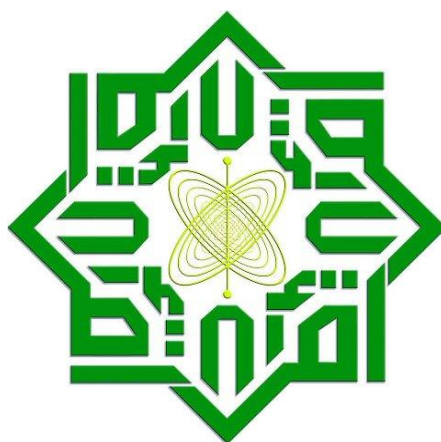


LAPORAN PENELITIAN

“ISOLASI SENYAWA BIOAKTIF ANTIMIKROBA DARI PELEPAH KELAPA SAWIT (*Elaeis guineensis* Jacq)”



BIDANG KEILMUAN : PETERNAKAN

Oleh :

Dr. DEWI FEBRINA. S. Pt., MP NIDN : 2002027301

drh. RAHMI FEBRIYANTI. M.Sc NIDN : 2008028401

ZUMARNI. S.Pt., M.P NIDN : 2023108501

**LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI SULTAN SYARIF KASIM RIAU
PEKANBARU**

2017

BAB I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tingginya kandungan lignin menyebabkan terbatasnya penggunaan pelepah kelapa sawit sebagai pakan (Febrina *et al.*, 2016a; Febrina *et al.*, 2016b), sehingga sulit didegradasi baik secara kimia dan enzimatik (Ohkuma *et al.*, 2001). Lignin, selulosa dan hemiselulosa adalah komponen utama pelepah kelapa sawit (Perez *et al.*, 2002). Perlakuan fisik, kimia dan biologi maupun kombinasi ketiganya dapat memecah ikatan lignoselulosa.

Penambahan alkali (NaOH dan $\text{Ca}(\text{OH})_2$), serta amoniasi dengan ammonia dan prekursor ammonia (urea) merupakan perlakuan secara kimia. Amoniasi menggunakan urea dapat menyebabkan perubahan komposisi dan struktur dinding sel, terlepasnya ikatan antara lignin dengan selulosa dan hemiselulosa, meningkatnya ketersediaan energi untuk pertumbuhan mikroba serta meningkatkan pencernaan nutrisi. Perlakuan secara biologi melalui teknik fermentasi dapat dilakukan melalui penambahan mikroorganisme seperti feses ternak.

Fermentasi pelepah kelapa sawit dengan penambahan inokulum dapat memperbaiki kandungan nutrisi, seperti dilaporkan Biyatmoko (2013), terjadi peningkatan protein kasar hasil fermentasi pelepah kelapa sawit. Feses sapi yang ditambahkan pada proses fermentasi serat buah kelapa sawit meningkatkan kandungan nutrisi dan pencernaan (*in vitro*) (Mucra, 2007). Penambahan feses sapi pada proses fermentasi ransum komplit berbahan limbah perkebunan kelapa sawit menurunkan kandungan serat kasar (Junaidi, 2010). Amoniasi pelepah sawit dengan penambahan urea 4% meningkatkan kandungan protein kasar dan menurunkan kandungan bahan kering, NDF dan ADF (Imsya, 2006).

Senyawa antimikroba bersifat *bakteriostatik* karena menghambat pertumbuhan mikroorganisme merugikan serta bersifat *bakterisid* karena membunuh bakteri. Umumnya antimikroba dihasilkan oleh mikroorganisme, seperti jamur dan bakteri atau dapat juga diproduksi secara sintesis atau semi-sintesis (Guardabassi dan Kruse 2008). Senyawa antimikroba alami dari hewan

seperti laktoferin, laktoperoksidase, laktoglobulin dan laktolipida pada susu (Naufalin dan Herastuti2012); dan dari tanaman seperti fitoaleksin, asam organik, minyak essensial (atsiri), fenolik dan beberapa kelompok pigmen tanaman atau senyawa sejenis (Nychas dan Tassou, 2000).

Limbah lapangan perkebunan kelapa sawit antara adalah pelepah kelapa sawit dapat digunakan sebagai pakan (Febrina *et al.*, 2017), ekstrak etanol yang berasal dari pelepah kelapa sawit bersifat antimikroba (Febrina dan Handoko, 2016). Daun kelapa sawit bersifat sebagai antibakteri (Chong *et al.*, 2008) karena mengandung flavonoid (*chrysoeriol* dan *luteolin*) (Nyananyo *et al.*, 2010), alkaloid, fenolik, steroid dan tanin (Sasidharan *et al.*, 2010); aktivitas antimikroba, penyembuhan luka (Vijayarathna *et al.*, 2012); kanker, sakit kepala, rematik, diuretik dan obat gosok (Irvin, 1985). *C.albicans* yang paling potensial terhadap ekstrak dan fraksi senyawa bioaktif dari bagian pelepah kelapa sawit dibandingkan *S.aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *S.paratyposa* dan *M. Gypseum* (Hamzah dan Hamzah, 2012).

Ekstraksi bertujuan untuk memisahkan zat pelarut dengan zat terlarut. Proses ekstraksi dipengaruhi oleh pelarut (Depkes RI, 2008). Prinsip kelarutan dalam metode ekstraksi akan melarutkan senyawa polar dengan pelarut yang sesuai begitu juga dengan pelarut non polar (Khoppkar, 1990).

Metanol adalah pelarut universal yang melarutkan senyawa polar dan nonpolar, seperti alkaloid, steroid, saponin dan flavonoid (Thompson, 1985) serta fenolik, dan tanin (Suryanto dan Wehantouw, 2009). Daun kelapa sawit yang diekstraksi dengan methanol mengandung senyawa tannin, alkaloid, saponin, terpenoid dan flavanoid (Sasidharan *et al.*, 2010); dan uji toksisitas pada udang dan tikus menunjukkan ekstrak daun kelapa sawit aman dikonsumsi dan direkomendasikan sebagai produk alami (Syahmi *et al.*, 2010).

Etil asetat mempunyai toksisitas rendah, non higroskopis serta mudah menguap (USP, 2008; Rowe *et al*, 2009; Wardhani dan Sulistyani, 2012) dan bersifat bersifat semi polar (Yudiastuti dkk., 2007). Daun binahong (*Anredera scandens* (L.) Moq.) yang diekstraksi dengan etil asetat mengandung senyawa polifenol dan saponin (Wardhani dan Sulistyani, 2012)

Bekatul yang diekstraksi dengan pelarut heksan menghasilkan rendemen terbesar dan melarutkan minyak bekatul secara sempurna (Susanti *et al.*, 2012).

Pelepah kelapa sawit yang diekstraksi dengan etanol mengandung senyawa tanin dan steroid yang berpotensi sebagai senyawa antimikroba Febrina dan Handoko (2016). Selanjutnya dijelaskan pengujian aktivitas antimikroba terhadap bakteri Gram positif (*S.aureus*) dan Gram negatif (*E. coli*) pada konsentrasi 5% menghasilkan diameter zona bening 2 mm, tergolong aktivitas rendah. Perlu dilakukan penelitian lanjutan yaitu penggunaan sumber inokulum yang berbeda (feses ayam, feses sapi, urea dan molasses) dalam proses fermentasi pelepah kelapa sawit yang memberikan hasil terbaik dinilai dari kualitas fisik dan kandungan fraksi serat. Selanjutnya diekstrak dengan pelarut berbeda (methanol, etil asetat dan n heksana) untuk mengisolasi senyawa bioaktif antimikroba dari pelepah kelapa sawit fermentasi,

1.2 Rumusan Masalah

- a. Jenis inokulum manakah (feses ayam, feses sapi, urea dan molasses) yang memberikan pengaruh terbaik terhadap kualitas fisik dan kandungan fraksi serat pelepah kelapa sawit fermentasi?
- b. Jenis pelarut manakah (methanol, etil asetat dan n heksan) yang mampu mengisolasi senyawa bioaktif antimikroba dari ekstrak pelepah kelapa sawit fermentasi?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui jenis inokulum terbaik (feses ayam, feses sapi, urea dan molasses) yang menghasilkan kualitas fisik terbaik (pH, aroma, warna dan tekstur) dan kandungan fraksi serat terendah (NDF, ADF dan lignin) dari pelepah kelapa sawit fermentasi
2. Untuk menentukan jenis pelarut terbaik (methanol, etil asetat dan n heksan) yang mampu mengisolasi senyawa bioaktif antimikroba dari ekstrak pelepah kelapa sawit fermentasi

1.4 Manfaat Penelitian

1. Memberikan informasi tentang jenis inokulum terbaik (feses ayam, feses sapi, urea dan molasses) yang menghasilkan kualitas fisik terbaik (pH, aroma, warna dan tekstur) dan kandungan fraksi serat terendah (NDF, ADF dan lignin) pada pelepah kelapa sawit fermentasi
2. Memberikan informasi tentang pelarut terbaik (methanol, etil asetat dan n heksan) yang mampu mengisolasi senyawa bioaktif antimikroba dari ekstrak pelepah kelapa sawit fermentasi
3. Mengurangi pencemaran lingkungan dengan memanfaatkan limbah perkebunan seperti pelepah sawit sebagai bahan pakan dan antimikroba.
4. Senyawa bioaktif yang ditemukan dapat dijadikan sebagai senyawa bioaktif alami (pengganti senyawa bioaktif sintetis) dalam bidang pertanian, peternakan maupun medis

1.5 Hipotesis Penelitian

1. Penambahan feses ayam pada proses fermentasi pelepah kelapa sawit menghasilkan kualitas fisik terbaik (pH, aroma, warna dan tekstur) dan kandungan fraksi serat terendah (NDF, ADF dan lignin)
2. Proses ekstraksi pada pelepah kelapa sawit fermentasi menggunakan pelarut methanol mampu mengisolasi senyawa bioaktif antimikroba

1.6 Ruang Lingkup Penelitian

1. Penelitian ini berkaitan dengan bidang mikrobiologi, biokimia, nutrisi dan pakan serta kesehatan ternak.
2. Penelitian ini berkaitan dengan upaya
 - a. menemukan jenis inokulum terbaik (feses ayam, feses sapi, urea dan molasses) pada fermentasi pelepah kelapa sawit yang dapat menghasilkan kualitas fisik terbaik (pH, aroma, warna dan tekstur) serta kandungan fraksi serat terendah (NDF, ADF dan lignin)
 - b. menemukan jenis pelarut terbaik (methanol, etil asetat dan n heksan) yang mampu mengisolasi senyawa bioaktif antimikroba dari ekstrak pelepah kelapa sawit fermentasi

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Senyawa Antimikroba

Antimikroba dapat menghambat pertumbuhan atau membunuh bakteri dan mikroorganisme lain (Pelczar dan Chan 1988; Rahmatini, 2016; Setiabudi, 1995).

Persyaratan yang harus dipenuhi oleh senyawa antimikroba antara lain mampu membunuh mikroorganisme patogen, kelarutan tinggi, stabil, tidak toksik bagi manusia dan hewan, tidak berkarat dan berwarna, harga terjangkau dan mudah diperoleh (Pelczar dan Chan 1988). Antimikroba yang ideal menunjukkan toksisitas yang selektif yaitu bersifat sangat toksik untuk mikroba, tetapi relatif tidak toksik (dalam konsentrasi yang dapat ditoleransi) terhadap hospes (Setiabudi, 1995). Selanjutnya dijelaskan berdasarkan sifat toksisitas selektif, antimikroba dibedakan atas aktivitas bakteriostatik yang menghambat pertumbuhan aktivitas bakterisid yang membunuh mikroba. Untuk menghambat pertumbuhan mikroba atau membunuhnya digunakan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Bakteriostatik dapat menjadi bakterisid bila kadar antimikrobanya ditingkatkan melebihi KHM (Setiabudi, 1995).

Antimikroba berspektrum luas dapat menimbulkan super infeksi, hal ini dipengaruhi oleh : penyakit yang menurunkan daya tahan tubuh, antimikroba yang terlalu lama digunakan dan c) serta pemberian obat secara tunggal maupun kombinasi (Tanu, 2009). Batas konsentrasi antimikroba pada organisme ditunjukkan dengan kepekaan mereka, di atas batas berarti peka dan di bawah batas berarti resisten (Suwandi, 1992).

2.2 Senyawa Bioaktif Pelepah Kelapa Sawit

Pelepah kelapa adalah limbah perkebunan kelapa sawit, dapat menggantikan 100% rumput Gajah sebagai hijauan pakan (Febrina, 2016) dengan kandungan lignin 30,18% (Febrina *et al.*, 2016a; Febrina *et al.*, 2016b) dan berpotensi sebagai senyawa antimikroba (Febrina dan Handoko, 2016). Ekstrak methanol daun kelapa sawit berpotensi sebagai antioksidan (Sasidharan *et al.*, 2009).

Bagian kelapa sawit (pelepah), mengandung *flavonoid*, *triterpenoid*, *alkaloid*, *steroid*, dan tanin (Hamzah dan Hamzah, 2012). Pelepah kelapa sawit yang diekstraksi dengan etanol mengandung tanin dan steroid (Febrina dan Handoko, 2016). Daun kelapa sawit yang diekstraksi dengan etanol mengandung tanin, flavonoid, triterpenoid dan alkaloid; fraksi etil asetat mengandung alkaloid, tanin, flavonoid serta fraksi etanol mengandung tanin, alkaloid dan steroid Febriani (2014).

BAB III. MATERI DAN METODA

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Proses fermentasi dilakukan di Laboratorium Ilmu Nutrisi dan Kimia Fakultas Pertanian dan Peternakan UIN SUSKA RIAU dan proses maserasi serta uji penapisan fitokimia untuk mengisolasi senyawa bioaktif antimikroba dari ekstrak pelepah kelapa sawit fermentasi dikerjakan di Laboratorium Kimia Bahan Alam Pusat Penelitian Bioteknologi LIP pada bulan Juni–November 2017.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1. Bahan Penelitian :

Larutan NDS, larutan ADS, aseton, alkohol, octanol, H_2SO_4 , n heksan etil, asetat, methanol, *rotary vacuum evaporator*, kertas saring, HCl, ammonia, pereaksi mayer, pereaksi dragendorff, eter, pereaksi Liebermann Bouchard, serbuk Mg, amil alkohol, NaOH, $FeCl_3$, aquadest, feses ayam, feses sapi, urea, molasses, kantong plastik.

3.2.2 Alat Penelitian :

Leaf chopper, cawan crusibel, *Fibertec hot extraction*, *Fibertec cold extraction*, oven, desikator, tanur, timbangan analitik, *dropple plate*, penangas air.

3.3 Metoda Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui 2 tahapan :

1. Tahap I (Proses Fermentasi Pelepah Kelapa Sawit)

Proses fermentasi pelepah kelapa sawit dengan sumber inokulum berbeda menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan masing-masing dengan 4 ulangan (Steel dan Torrie, 2002).

Perlakuan adalah :

A = fermentasi pelepah kelapa sawit dengan penambahan feses ayam

B = fermentasi pelepah kelapa sawit dengan penambahan feses sapi

C = fermentasi pelepah kelapa sawit dengan penambahan urea

D = fermentasi pelepah kelapa sawit dengan penambahan molasses

Parameter yang diukur adalah :

- a. Karakteristik fisik (pH, aroma, warna dan tekstur)
 - b. Kandungan fraksi serat (NDF, ADF, hemiselulosa, selulosa dan lignin)
2. Tahap II (ekstraksi dan isolasi senyawa bioaktif antimikroba pelepah kelapa sawit fermentasi)

Untuk mengisolasi senyawa bioaktif antimikroba dari ekstrak pelepah kelapa sawit fermentasi dilakukan proses maserasi dan diekstraksi dengan pelarut berbeda (methanol, n heksan dan etil asetat). Selanjutnya dilakukan penapisan fitokimia untuk mengetahui senyawa bioaktif antimikroba dari ekstrak pelepah kelapa sawit fermentasi.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Penyiapan bahan

Sebanyak dua per tiga ($2/3$) pelepah sawit atau bagian depan (mempunyai 150-2000 helai daun dicacah menggunakan *Leaf Chopper* (Gambar 2).



Gambar 2. Proses Persiapan Bahan

3.4.2 Proses Fermentasi

Proses fermentasi pelepah sawit dengan sumber inokulum berbeda berdasarkan Febrina (2016) yang dimodifikasi. Pelepah kelapa sawit yang sudah dicacah menggunakan *Leaf Chopper*, kemudian ditimbang, selanjutnya ditambah aquades sehingga kadar airnya mencapai 70%. Penambahan inokulum sesuai perlakuan yaitu : feses ayam 10%: feses sapi 10%: urea 5% dan molasses 5%. Kemudian diaduk merata dan dimasukkan ke dalam plastik, dipadatkan agar

tercipta kondisi *anaerob* kemudian diikat dan dilapisi plastik berikutnya (sebanyak 3 lapisan). Fermentasi berlangsung 21 hari, setelah 21 hari dilakukan penilaian karakteristik fisik (pH, warna, aroma dan tekstur) selanjutnya ditimbang berat segarnya dan dipanaskan dengan suhu 50°C setelah kering diekstraksi dan dilakukan penapisan fitokimia. (Gambar 3).

3.4.3 Penilaian Kualitas Fisik Silase

Penilaian kualitas fisik silase meliputi pH, warna, bau atau aroma, tekstur, dan keberadaan jamur, seperti terlihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Kriteria Kualitas Silase

Kriteria	Baik Sekali	Baik	Sedang	Buruk
Warna	Hijau Tua	Hijau Kecoklatan	Hijau Kecoklatan	Tidak Hijau
Jamur	Tidak ada	Sedikit	Agak banyak	Banyak
Bau	Asam	Asam	Kurang asam	Busuk
pH	3,2 – 4,2	4,2 – 4,5	4,5 – 4,8	>4,8

Sumber : Wilkins (1988)

3.4.4 Analisis Kandungan Nutrisi (Fraksi Serat)

Penetapan kandungan fraksi serat (lignin, selulosa, hemiselulosa, NDF dan ADF) berdasarkan (Foss Analytical, 2006).

3.4.4.1 Kandungan Neutral Detergent Fiber (NDF)

- Ditimbang sampel 0,5 g (a), dimasukkan ke dalam cawan crusibel.
- Cawan crusibel diletakkan pada *Fibertec Hot Extraction*, ditambahkan 50 ml larutan NDS, dipanaskan sampai mendidih, setelah mendidih diteteskan octanol pada sampel yang berbuih, lalu panas dioptimumkan dan dilakukan ekstraksi selama 1 jam.
- Setelah selesai diekstraksi dilakukan penyaringan dengan pemvakuman pada *Fibertec Hot Extraction* kemudian dibilas dengan air panas.
- Cawan crusibel dipindahkan pada *Fibertec Cold Extraction*, dilakukan pembilasan dengan aceton/alkohol 96%. Cawan crusibel dan sampel dipanaskan 2 jam pada temperatur 135°C didinginkan dan ditimbang (c).

- e. Sampel pada cawan crusibel yang telah diovenkan dan ditimbang beratnya dilakukan pengabuan selama 3 jam pada temperatur 525-550⁰C, dinginkan dan timbang (b).

$$\text{Rumus : } \% \text{ NDF} = \frac{c - b}{a} \times 100\%$$

3.4.4.2 Kandungan ADF (Acid Detergent Fiber)

- a. Ditimbang sampel 0,5 g dimasukkan ke dalam cawan crusibel (a)
- b. Cawan crusibel diletakkan pada *Fibertec Hot Extraction*, tambahkan 50 ml larutan ADS, dipanaskan sampai mendidih, setelah mendidih diteteskan octanol pada sampel yang berbuih, lalu panas dioptimumkan dan dilakukan ekstraksi selama 1 jam.
- c. Setelah selesai diekstraksi selama 1 jam dilakukan penyaringan dengan pemvakuman pada *Fibertec Hot Extraction* dan dibilas dengan air panas.
- d. Cawan crusibel dipindahkan pada *Fibertec Cold Extraction* kemudian dibilas dengan acetone/alkohol 96%. Cawan crusibel dan sampel dipanaskan selama 2 jam pada temperatur 135⁰C dinginkan dan timbang (c).
- e. Sampel yang ada dalam cawan crusibel yang telah dipanaskan dan ditimbang beratnya dilakukan selama 3 jam pada temperatur 525-550⁰C 3 jam, didinginkan dan timbang (b).

$$\text{Rumus : } \% \text{ ADF} = \frac{c - b}{a} \times 100\%$$

3.4.4.3 Penetapan Kandungan Selulosa dan ADL

- a. Selulosa ditentukan dengan merendam residu dari analisa ADF yang telah diketahui beratnya (c) dalam H₂SO₄ 72% selama 3 jam.
- b. Setelah itu dibilas dengan air panas hingga airnya berwarna bening dan terakhir dengan aseton 30 ml.
- c. Panaskan cawan crusibel pada suhu 135⁰C selama 2 jam dan ditimbang (d) setelah itu diabukan dalam tanur pada suhu 525–550⁰C dan ditimbang (e).

$$\text{Rumus : \% Selulosa} = \frac{c-d}{a} \times 100\%$$

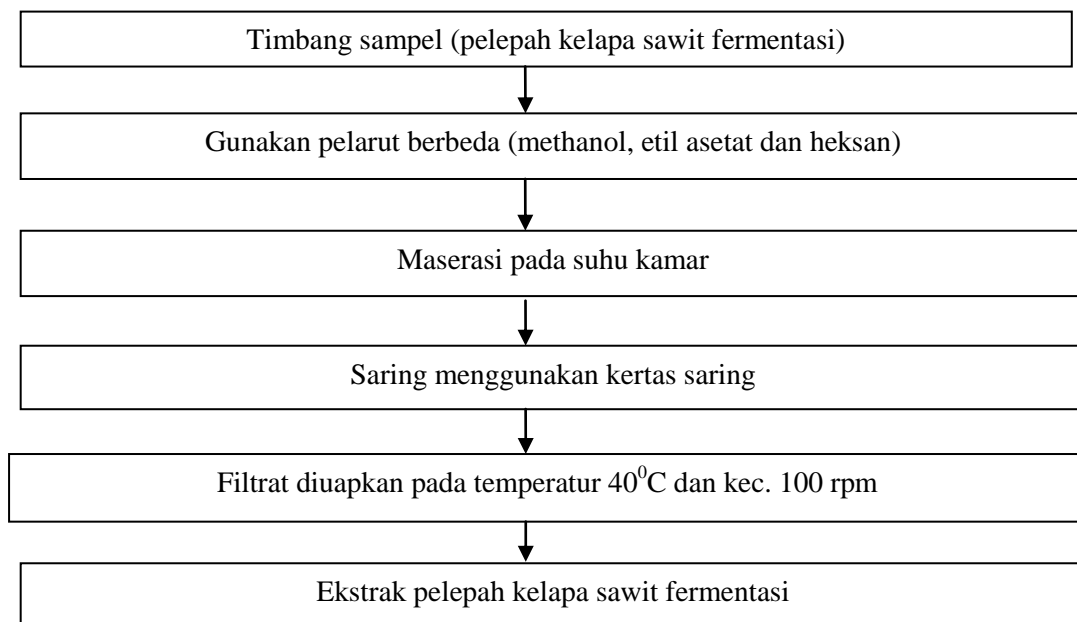
$$\text{Rumus : \% ADL} = \frac{d-e}{a} \times 100\%$$

3.4.4.4 Penetapan Kandungan Hemiselulosa

$$\text{Hemiselulosa} = \% \text{ NDF} - \% \text{ ADF}$$

3.4.5 **Proses Ekstraksi**

Proses ekstraksi mengacu kepada Suryani *et al* (2016) dengan modifikasi (Gambar 3.)



Gambar 3. Diagram Alir Pembuatan Ekstrak Pelepah Kelapa Sawit Fermentasi

3.4.6 **Penapisan Fitokimia (Franswort, 1996; Harborne, 1987).**

3.4.6.1 Uji alkaloid

Sampel 0,5 g fraksi aktif ditambah 5 ml asam klorida 10%, dikocok dan ditambah 5 ml larutan amonia 10%. Diekstraksi dengan kloroform dan diuapkan. Residu sisa penguapan ditambah 1,5 ml asam klorida 2%, bagikan ke dalam dua tabung. Tabung pertama tambahkan 2-3 tetes pereaksi Mayer, Jika terbentuk endapan putih kekuningan menunjukkan adanya alkaloid. Tabung kedua ditambah

2-3 tetes pereaksi Dragendorff, adanya senyawa alkaloid, jika ada endapan merah bata.

3.4.6.2 Uji steroid/terpenoid

Ekstrak etil asetat dimaserasi dengan beberapa mL eter lalu dipindahkan ke dalam *dropple plate* untuk diuji dengan pereaksi Liebermann Bouchard (2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat). Residu yang tidak larut dalam eter selanjutnya dihidrolisis dengan HCl 2N di atas penangas air kemudian dilarutkan dalam eter dan diuji kembali dengan pereaksi Liebermann Bouchard. Terbentuknya warna biru atau hijau menunjukkan adanya steroid dan warna merah adanya terpenoid.

3.4.6.3 Uji flavonoid, saponin, tanin dan kuinon

Sebanyak 0,5 g fraksi aktif dilarutkan dalam 10 ml air dan dipanaskan di atas penangas air kemudian larutan tersebut dibagi ke dalam empat tabung:

Tabung pertama : sebanyak lebih kurang 100 mg serbuk magnesium dimasukkan ke dalam tabung pertama lalu ditambah 1 ml asam klorida pekat dan 3 ml amil alkohol, dikocok kuat dan dibiarkan memisah. Warna merah, kuning, jingga pada lapisan amil alkohol menunjukkan adanya flavonoid.

Tabung kedua : tabung kedua dikocok secara vertikal selama 10 detik, maka akan terbentuk busa stabil, dibiarkan selama 10 menit, ditambahkan 1 tetes asam klorida 1%, Jika busa tidak hilang maka menunjukkan adanya saponin.

Tabung ketiga : tabung ketiga ditambahkan beberapa tetes natrium hidroksida 1 N, adanya larutan warna merah menunjukkan adanya kuinon.

Tabung keempat : tabung keempat ditambahkan beberapa tetes larutan besi (III) klorida 1%, terbentuknya larutan warna biru tua atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin.

3.4.6.4 Uji kumarin

Sebanyak 0,5 g fraksi aktif ditambahkan 10 ml eter, setelah dingin lalu disaring. Filtrat diuapkan, ditambahkan 10 ml air panas dan didinginkan kemudian ditambahkan 0,5 ml larutan ammoniak 10%. Adanya fluoresensi hijau atau biru pada sinar UV menunjukkan adanya kumarin

3.4.6.5 Uji fenolik

Identifikasi adanya senyawa fenolik dalam suatu cuplikan dapat dilakukan dengan pereaksi besi (III) klorida (FeCl_3) 1% dalam etanol. Adanya senyawa fenolik ditunjukkan oleh timbulnya warna hijau, merah ungu, biru atau hitam yang kuat

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Pengaruh Penambahan Sumber Inokulum Berbeda terhadap Kualitas Fisik Pelepah Kelapa Sawit Fermentasi

Penambahan sumber inokulum yang tidak sama mempengaruhi ($P < 0,05$) kualitas fisik pelepah kelapa sawit fermentasi meliputi pH, aroma, warna dan tekstur (Tabel 2).

Tabel. 2 Pengaruh Penambahan Sumber Inokulum Berbeda terhadap Kualitas Fisik Pelepah Kelapa Sawit Fermentasi

Perlakuan	Kualitas Fisik							
	pH		Aroma		Warna		Tekstur	
	Nilai	Ket	Nilai	Ket	Nilai	Ket	Nilai	Ket
A	5,18 ^a ±0,10	Asam	3,00 ^b ±0,00	Asam	3,03 ^a ±0,05	Hijau kekuningan	2,00 ^a ±0,00	Lebih lunak
B	5,52 ^b ±0,20	Asam	4,00 ^c ±0,00	Lebih asam	3,00 ^a ±0,00	Hijau kekuningan	3,00 ^b ±0,00	Lunak
C	7,60 ^c ±0,14	Basa	2,03 ^a ±0,05	Tidak asam	4,03 ^b ±0,05	Hijau kecoklatan	3,03 ^b ±0,05	Lunak
D	5,28 ^{ab} ±0,21	Asam	5,00 ^d ±0,00	Sangat asam	3,00 ^a ±0,00	Hijau kekuningan	3,00 ^b ±0,00	Lunak

Ket : A = fermentasi pelepah kelapa sawit dengan penambahan feses ayam

B = fermentasi pelepah kelapa sawit dengan penambahan feses sapi

C = amoniasi pelepah kelapa sawit dengan penambahan urea

D = fermentasi pelepah kelapa sawit dengan penambahan molases

huruf kecil di kolom sama menunjukkan berbeda nyata ($P < 0,05$)

4.1.1 Derajat Keasaman (pH).

Penambahan feses ayam sebagai sumber inokulum pada fermentasi pelepah kelapa sawit menghasilkan pH terendah yaitu 5,18 tidak berbeda ($P > 0,05$) dibandingkan penambahan molasses (5,28) tapi nyata lebih rendah ($P < 0,05$) dibandingkan feses sapi (5,52) dan urea (7,60). Rendahnya nilai pH (5,18) pada perlakuan dengan penambahan feses ayam berhubungan dengan ketersediaan karbohidrat dan produksi Bakteri Asam Laktat. Penambahan feses ayam pada fermentasi pelepah kelapa sawit berfungsi untuk memacu pertumbuhan BAL (Bakteri Asam Laktat). Peningkatan produk asam laktat akan merendahkan pH sehingga pertumbuhan bakteri patogen terhambat.

Penambahan molases menghasilkan nilai pH 5,28 yang tidak berbeda ($P > 0,05$) dibandingkan feses ayam (5,18). Penambahan molases bertujuan sebagai sumber energi bagi pertumbuhan mikroba. Tersedianya energi untuk pertumbuhan

mikroba terutama Bakteri Asam Laktat yang memicu mikroba untuk memproduksi asam laktat sehingga akan menurunkan pH. Wikanastri dkk (2012) menyatakan pH berhubungan dengan produksi asam laktat selama proses fermentasi yang menghambat pertumbuhan mikroba patogen. Fermentasi pelepah kelapa sawit menggunakan *Trichoderma sp* menghasilkan pH 5,42–5,71 (Jaelani dkk, 2015).

Penambahan feses sapi pada proses fermentasi pelepah kelapa sawit menghasilkan pH 5,52 dan tidak nyata ($P>0,05$) dibanding penambahan molases (5,28) tapi berbeda ($P<0,05$) lebih besar dibanding penambahan feses ayam (5,18) dan nyata ($P<0,05$) lebih rendah dibanding penambahan urea (7,60). Tingginya nilai pH pada perlakuan dengan penambahan feses sapi dibandingkan penambahan feses ayam diduga pada feses sapi bakteri yang lebih dominan adalah jenis *Bacillus* sehingga asam laktat yang dihasilkan lebih rendah akibatnya pH yang dihasilkan lebih tinggi.

Febrina *et al* (2011) melaporkan bakteri yang berperan dalam proses fermentasi menggunakan feses sapi pada ransum berbahan limbah perkebunan kelapa sawit adalah : *Bacillus sp 3*, *Bacillus sp2*, *Bacillus sp 1*, , *Celulomonas sp*, *Clostridium sp*, *Pseudomonas sp*, *Lactobacillus sp 2*, *Lactobacillus sp 1*, *Ruminococcus sp 1* dan *Ruminococcus sp2*. Saidi *et al* (2011) melaporkan bakteri yang termasuk golongan Bakteri Asam Laktat adalah *Lc. lactis subsp. lactis*; *Lc. lactis subsp. lactis biovar*; *diacetyllactis*; *Leuconostoc*; *Streptococcus*; *Pediococcus* and *Lactobacillus*. Karbohidrat yang mudah larut akan digunakan sebagai energy oleh Bakteri Asam Laktat untuk memproduksi asam laktat yang akhirnya merendahkan pH.

Proses amoniasi pelepah kelapa sawit menggunakan urea menghasilkan pH tertinggi yaitu 7,60 yang bersifat basa dan lebih besar ($P<0,05$) dibanding lainnya. Pada proses amoniasi urea akan terurai menjadi ion ammonium sehingga produk amoniasi bersifat basa. Laura dan Paolo (2006) menyatakan urea akan terurai menjadi ion ammonium yang bersifat basa dan proses amoniasi dapat memecah ikatan glikosida (Umiyasih dan Wina, 2008) sehingga hasil fermentasi pelepah kelapa sawit ini dapat didegradasi oleh mikroba rumen.

4.1.2 Aroma

Penambahan sumber inokulum yang berbeda pada fermentasi pelepah kelapa sawit nyata ($P < 0,05$) mempengaruhi aroma. Skor aroma terendah adalah 2,03 (tidak asam) pada perlakuan dengan penambahan urea dan skor tertinggi yaitu 5 (sangat asam) pada perlakuan dengan penambahan molasses.

Skor aroma pada perlakuan dengan penambahan urea adalah 2,03 dengan kriteria tidak asam. Hal ini disebabkan pada proses amoniasi menggunakan urea maka urea akan dihidrolisis menjadi ammonia dan CO_2 yang bersifat alkali sehingga pH yang dihasilkan bersifat basa (nilai pH 7,6) sehingga produk amoniasi yang dihasilkan beraroma tidak asam dan tidak busuk. Hasil yang hampir sama dilaporkan Puspitasari *et al* (2014) amoniasi urea pada daun nenas menghasilkan skor aroma 2,67–2,87.

Skor aroma pada penambahan feses ayam sebagai sumber inokulum adalah 3 dengan kriteria asam. Hal ini menunjukkan proses fermentasi berlangsung baik yang ditandai dengan produk yang dihasilkan berbau asam khas fermentasi. Aroma asam yang dihasilkan ini juga berhubungan dengan produksi asam laktat dan pH. Terlihat pada Tabel 4.1 penambahan feses ayam pada proses fermentasi pelepah kelapa sawit menghasilkan pH terendah (5,18) sehingga produk yang dihasilkan beraroma asam.

Penambahan feses sapi menghasilkan aroma lebih asam dengan skor 4 dan nyata berbeda ($P < 0,05$) dibandingkan perlakuan lainnya. Tingginya skor aroma (4) pada perlakuan dengan penambahan feses sapi diduga proses fermentasi berlangsung secara heterofermentatif karena feses sapi mengandung bakteri : *Bacillus*, *Celulomonas*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, dan *Ruminococcus* (Febrina *et al.*, 2011), sehingga yang dihasilkan bukan hanya asam laktat saja tetapi juga asam asetat, propionat, butirat dan alkohol dengan demikian produk fermentasi yang dihasilkan bersifat lebih asam dengan skor 4. Saun dan Henrich (2008) menyatakan fermentasi yang berlangsung secara heterofermentatif menghasilkan pH 4,5–5.

Molasses merupakan hasil samping pada proses pengolahan gula dan penambahan molasses pada proses fermentasi bertujuan sebagai sumber energi

bagi pertumbuhan mikroba. Molases dapat berfungsi sebagai sumber karbohidrat (Ridwan dkk., 2005). Penambahan molases pada fermentasi pelepah kelapa sawit menghasilkan skor aroma 5 dengan kriteria sangat asam. Hal ini menunjukkan tersedianya energi bagi BAL memproduksi asam laktat untuk merendahkan pH. bekerja optimal untuk menghasilkan asam laktat yang merendahkan pH dan menghasilkan produk fermentasi yang beraroma sangat asam. Hasil yang hampir sama dilaporkan Hidayat (2014) penambahan tetes 3% pada proses silase rumput Raja dengan lama pemeraman 28 hari menghasilkan skor aroma 4,67.

4.1.3 Warna

Fermentasi pelepah kelapa sawit menggunakan feses ayam, feses sapi dan molasses menghasilkan warna yang tidak berbeda ($P>0,05$) yaitu warna hijau alami atau hijau kekuningan dengan skor warna 3–3,03. Hal ini menunjukkan hasil fermentasi dari segi warna berkualitas baik karena menghasilkan warna alami khas fermentasi yaitu hijau kekuningan. Warna silase akan sama dengan warna bahan sebelum disilase (Saun dan Heinrich, 2008).

Terjadinya perubahan warna dari hijau menjadi hijauan kekekuningan disebabkan pada fase *anaerobic* oksigen sudah habis maka karbohidrat akan menghasilkan CO_2 , H_2O dan panas. Panas yang dihasilkan menyebabkan terjadi perubahan warna dari hijauan menjadi hijau kekuningan. Penambahan Bakteri Asam Laktat pada jerami kacang tanah menghasilkan skor warna 3 dengan kriteria hijau kekuningan (Probowo dkk, 2013).

Penambahan urea pada proses amoniasi pelepah kelapa sawit menghasilkan produk ammoniasi berwarna hijau kecoklatan dengan skor 4,03 dan lebih tinggi ($P<0,05$) dibanding penambahan feses ayam, feses sapi dan molasses. Tingginya skor warna dan warna menjadi lebih gelap yaitu hijau kecoklatan pada penambahan urea disebabkan CO_2 yang dihasilkan lebih banyak dibandingkan perlakuan. Produksi CO_2 pada proses amoniasi berasal dari CO_2 yang dihasilkan pada fase *anaerobic* dan pemecahan urea menjadi ammonia dan CO_2 , sehingga kadar CO_2 yang dihasilkan lebih banyak dan panas yang lebih tinggi. Tingginya panas yang dihasilkan menyebabkan warna menjadi lebih gelap (hijau kecoklatan).

4.1.4 Tekstur

Tekstur produk fermentasi pelepah kelapa sawit menggunakan sumber inokulum yang berbeda berkisar dari lebih lunak sampai lunak (2 sampai 3,03). Penambahan feses ayam pada fermentasi pelepah kelapa sawit menghasilkan tekstur lebih lunak dengan skor 2 dan nyata berbeda ($P < 0,05$) dibandingkan penambahan feses sapi, urea dan molasses dengan skor 3 (lunak).

Tekstur hasil fermentasi pelepah kelapa sawit menggunakan feses ayam adalah lebih lunak dengan skor 2. Hal ini menunjukkan penambahan feses ayam pada proses fermentasi dapat mendukung pertumbuhan BAL untuk menghasilkan asam laktat. Optimalnya produksi asam laktat akan merendahkan pH sehingga pertumbuhan bakteri patogen terhambat. Kondisi pH yang rendah ini juga mendukung produksi enzim lignase yang berfungsi memecah lignoselulosa dan lignohemiselulosa sehingga menurunkan kandungan lignin. Hal ini terlihat perlakuan penambahan feses ayam menghasilkan kandungan lignin terendah yaitu 19,94% tidak berbeda dengan penambahan urea (21,57%) tapi nyata lebih rendah dibandingkan penambahan feses sapi (23,15%) dan molasses 22,41% (Tabel 4.2). Terlepasnya lignin dari selulosa dan hemiselulosa menyebabkan produk fermentasi mempunyai tekstur yang lebih lunak.

Proses fermentasi pelepah kelapa sawit dengan penambahan feses sapi, molasses dan urea pada menghasilkan tekstur yang sama ($P > 0,05$) yaitu lunak dengan skor 3–3,03. Hal ini menunjukkan proses fermentasi menggunakan feses sapi, molasses dan urea mampu merubah tekstur awal pelepah kelapa sawit yang kaku menjadi sedikit lunak. Puspitasari *et al* (2014) melaporkan amoniasi daun nenas menggunakan urea menghasilkan tekstur agak lunak dengan skor 2,47–2,67.

4.2 Pengaruh Penambahan Sumber Inokulum Berbeda terhadap Kandungan Fraksi Serat Pelepah Kelapa Sawit Fermentasi

Penambahan sumber inokulum yang berbeda memberikan pengaruh terhadap kandungan fraksi serat pelepah kelapa sawit hasil fermentasi dapat terlihat pada Tabel 3.

Tabel. 3. Pengaruh Penambahan Sumber Inokulum Berbeda terhadap Kandungan Fraksi Serat Pelepah Kelapa Sawit Fermentasi

Perlakuan	Kandungan Fraksi Serat (%)				
	NDF	ADF	Hemiselulosa	Selulosa	ADL
A	73,34±3,68	51,81±4,82	21,52±6,07	28,54±3,36	19,94 ^a ±1,47
B	75,39±2,03	55,03±4,23	20,35±4,46	29,57±3,09	23,15 ^b ±0,96
C	73,83±1,01	53,30±3,43	20,51±4,30	31,55±1,99	21,57 ^a ±1,58
D	74,98±3,52	54,04±4,48	20,93±6,63	31,70±4,27	22,41 ^b ±1,22

Ket : A = fermentasi pelepah kelapa sawit dengan penambahan feses ayam

B = fermentasi pelepah kelapa sawit dengan penambahan feses sapi

C = amoniasi pelepah kelapa sawit dengan penambahan urea

D = fermentasi pelepah kelapa sawit dengan penambahan molases

Superskrip yang tidak sama pada kolom yang sama memperlihatkan perbedaan sangat nyata ($P<0,01$).

Tabel 4. 2 memperlihatkan penambahan sumber inokulum yang tidak sama memberikan pengaruh yang sama ($P>0,05$) terhadap kandungan NDF, ADF, hemiselulosa dan selulosa tapi berbeda sangat nyata ($P<0,01$) pada kandungan ADL. Zain *et al* (2007) melaporkan peningkatan dosis urea dari 3% menjadi 6% dan 9% pada amoniasi daun sawit memberikan pengaruh yang sama terhadap fraksi serat (NDF, ADF, selulosa dan hemiselulosa).

4.2.1 NDF, ADF, Hemiselulosa dan Selulosa

Dinding sel tanaman terdiri dari Neutral Detergent Fiber, Acid Detergent Fiber, selulosa, hemiselulosa, lignin dan silika. Penambahan sumber inokulum yang berbeda (feses ayam, feses sapi, urea dan molasses) pada proses fermentasi pelepah kelapa sawit tidak memberikan berpengaruh ($P>0,05$) terhadap kandungan NDF diduga enzim selulase yang dihasilkan sama sehingga tidak memberikan pengaruh terhadap kandungan NDF.

Kandungan NDF pelepah kelapa sawit hasil fermentasi menggunakan sumber inokulum berbeda adalah 73,34–75,39%, nilai ini hampir sama dengan yang dilaporkan Imsya pelepah kelapa sawit yang difermentasi menggunakan feses ayam 15% dan urea dengan konsentrasi 0–6% berkisar 70,40%-78,05%: dan ampas tebu fermentasi dengan jamur tiram putih (*Pleurotus ostreatus*) kandungan NDF 77,07–79,15% (Tarmidi dan Hidayat, 2004).

Hasil yang sama juga ditunjukkan pada kandungan ADF, selulosa dan hemiselulosa. Hemiselulosa merupakan hasil pengurangan dari NDF dengan

ADF. Tidak adanya pengaruh penambahan sumber inokulum yang berbeda terhadap kandungan NDF dan ADF akan memberikan pengaruh yang sama yaitu tidak terjadi perubahan pada kandungan hemiselulosa.

4.2.2 Lignin

Dinding sel tanaman mengandung lignin yang mempunyai ikatan yang sangat kompleks dan susah dicerna. Tingginya kandungan lignin pada pakan akan menurunkan pencernaan. Kandungan lignin awal pelepah kelapa sawit, sebelum perlakuan adalah 30,18% (Febrina *et al.*, 2016a; Febrina *et al.*, 2016b). Salah satu tujuan amoniasi dan fermentasi pada pelepah kelapa sawit adalah untuk mengurangi kandungan lignin.

Penambahan sumber inokulum yang berbeda berpengaruh ($P < 0,01$) terhadap kandungan lignin. Kandungan lignin terendah terdapat pada penambahan feses ayam (19,94%) dan memberikan hasil yang sama ($P > 0,05$) dibanding dengan yang ditambah urea (21,57%) tapi lebih rendah ($P < 0,01$) dibanding feses sapi (23,15%) dan molasses (22,41%).

Rendahnya kandungan lignin pada perlakuan dengan penambahan feses ayam diduga proses fermentasi pelepah kelapa sawit menggunakan feses ayam menghasilkan enzim lignase dan urease yang lebih tinggi dibandingkan perlakuan lainnya. Enzim lignase merupakan enzim ekstraseluler yang berfungsi untuk mendegradasi lignin dan urease berfungsi memecah urea menjadi ammonia. Feses ayam juga berfungsi sebagai sumber urease yang akan memecah urea menjadi ammonia dan CO_2 . Tingginya kandungan N pada feses ayam yaitu 2,94% dan protein 12,27% (Suharyadi., 2012) diduga menyebabkan tingginya aktivitas urease pada feses ayam sehingga penambahan feses ayam sebagai sumber inokulum pada fermentasi pelepah sawit mampu menurunkan kandungan lignin. Penambahan feses ayam 15% pada amoniasi jerami pada dapat menurunkan lama fermentasi dari 20 hari menjadi 5 hari (Warli *et al.*, 1996).

Penambahan urea dalam proses amoniasi pelepah kelapa sawit menghasilkan kandungan lignin 21,57% dan hasilnya sama ($P > 0,05$) dibanding penambahan feses ayam. Penambahan urea dalam proses amoniasi berfungsi sebagai sumber Nitrogen karena urea mengandung 46% (Anonim, 2009) dan juga

berfungsi sebagai sumber enzim urease. Pada proses amoniasi urea akan dirobah menjadi alkali (NH_4OH) yang dapat merenggangkan ikatan lignoselulosa dan lignohemiselulosa sehingga memudahkan penetrasi enzim selulase yang dihasilkan oleh mikroorganisme untuk mendegradasi dinding sel sehingga menurunkan kandungan lignin. Hal ini terlihat penambahan urea 5% pada amoniasi pelepah kelapa sawit menurunkan kandungan lignin 28,53% (dari 30,18% menjadi 21,57%). Zain *et al* (2007) melaporkan terjadi penurunan lignin daun sawit dari 12,28% (tanpa amoniasi) menjadi 10,68% pada serat sawit yang diamoniasi urea 6% dan feses ayam 15%.

4.3 Ekstraksi Senyawa Bioaktif Pelepah Kelapa Sawit Fermentasi

Senyawa bioaktif yang terkandung pada ekstrak pelepah kelapa sawit fermentasi dapat diketahui melalui metode maserasi (perendaman tanpa panas) dengan proses ekstraksi bertingkat. Hal ini didasari senyawa bioaktif pada pelepah kelapa sawit fermentasi dapat dipisahkan melalui proses ekstraksi bertingkat berdasarkan kepolarannya. Oleh sebab itu pada penelitian ini proses ekstraksi dimulai (n heksan) (pelarut non polar), etil asetat (pelarut semi polar) dan methanol (pelarut polar).

Proses ekstraksi bertingkat pelepah kelapa sawit fermentasi pada setiap pelarut : n heksan, etil asetat dan methanol dilaksanakan selama 3 hari (3 x 24 jam) yang bertujuan agar semakin banyak rendemen ekstrak yang dihasilkan, karena semakin lama diekstraksi maka semakin banyak rendemen yang dihasilkan. Hasil ini berbeda dengan yang dilaporkan Salamah *et al* (2008) peningkatan lama ekstraksi kijang Taiwan dari 1 hari menjadi 2–3 hari tidak mempengaruhi rendemen ekstrak yang dihasilkan.

Setelah proses ekstraksi selesai maka hasil ekstrak dipekatkan dengan *Rotary vacuum evaporator* pada temperatur 50°C untuk mengurangi oksidasi (Gambar 4). Orsat dan Raghavan (2006) menyatakan pemanasan dengan suhu rendah ini dapat mengurangi terjadinya oksidasi. Pelarut-pelarut yang digunakan dalam penelitian ini mempunyai titik didih di bawah titik didih air yaitu n heksan

(69⁰C); etil asetat (77⁰C) dan methanol (78⁰C), sehingga mudah menguap jika dipanaskan pada suhu 50⁰C.



Gambar 4. Proses pemekatan ekstrak menggunakan *Rotary vacuum evaporator*

Hasil ekstraksi pelepah kelapa sawit fermentasi menggunakan pelarut dengan kepolaran yang berbeda akan menghasilkan rendemen ekstrak yang tidak sama. Jumlah ekstrak dibanding dengan jumlah sampel dikali seratus persen menunjukkan rendemen ekstrak yang dihasilkan. Tabel 4.3 memperlihatkan rendemen ekstrak pelepah kelapa sawit fermentasi.

Tabel 4. Rendemen Ekstrak Pelepah Kelapa Sawit Fermentasi

Perlakuan	Rendemen (%)		
	N heksan	Etil Asetat	Metanol
A	0,78	1,53	7,87
B	1,08	1,30	7,07
C	1,02	1,17	5,79
D	0,89	1,08	7,40

Ket : A = ekstrak pelepah kelapa sawit fermentasi dengan feses ayam
 B = ekstrak pelepah kelapa sawit fermentasi dengan feses sapi
 C = ekstrak pelepah kelapa sawit fermentasi dengan urea
 D = ekstrak pelepah kelapa sawit fermentasi dengan molases

Hasil ekstrak dipengaruhi oleh metode ekstraksi, ukuran partikel sampel, kondisi dan waktu penyimpanan, lama waktu ekstraksi, serta perbandingan jumlah pelarut terhadap jumlah sampel (Harborne 1998). Tabel 4 memperlihatkan ekstrak n asetat pelepah kelapa sawit fermentasi menghasilkan rendemen terendah berkisar 0,78–1,08% sedangkan ekstrak metanol menghasilkan rendemen terbesar

berkisar 5,79–7,87%. Hasil yang sama dilaporkan Salamah *et al* (2008) rendemen ekstrak kijing Taiwan terendah berasal dari ekstrak n-heksan (0,04%) dan rendemen tertinggi yaitu dari ekstrak metanol (0,12%).

Tingginya persentase rendemen ekstrak methanol menunjukkan senyawa bioaktif yang paling banyak terdapat pada pelepah kelapa sawit fermentasi bersifat polar karena dapat larut pada pelarut polar, yaitu metanol. Senyawa bioaktif ekstrak pelepah kelapa sawit fermentasi yang bersifat non polar dan semipolar terdapat dalam jumlah yang lebih kecil.

4.4 Senyawa Bioaktif Antimikroba Ekstrak Pelepah Kelapa Sawit Fermentasi

Ekstrak pelepah kelapa sawit fermentasi yang diperoleh dari proses ekstraksi bertingkat dengan pelarut n heksan, etil asetat dan methanol selanjutnya dilakukan pengujian senyawa bioaktif menggunakan metode uji penapisan fitokimia.

Pengujian secara kualitatif dilakukan untuk membuktikan keberadaan senyawa kimia tertentu yang dapat dideteksi dalam sampel. Metode uji berdasarkan perubahan warna atau terbentuknya endapan sebagai respon atas pereaksi tertentu (Harborne, 1998; Franswort, N. R. 1996). Hasil analisis fitokimia senyawa bioaktif ekstrak pelepah kelapa sawit fermentasi terlihat pada Tabel 5.

Hasil ekstraksi dipengaruhi oleh jenis pelarut yang tergantung tingkat kepolaran dan tingkat ketersediaanya dalam bahan yang diekstrak. Pada penelitian ini proses ekstraksi bertingkat dimulai dari jenis pelarut n heksan (non polar), etil asetat (pelarut semi polar) dan methanol (pelarut polar).

Tabel 5. Senyawa Bioaktif Ekstrak Pelepah Kelapa Sawit Fermentasi

Golongan Senyawa	n heksan				Etil Asetat				Metanol				Standar
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	
Alkaloid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Endapan merah bata
Steroid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Warna biru
Terpenoid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Warna merah
Flavanoid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Warna merah, kuning, jingga
Saponin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Busa tidak hilang
Kuinon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Warna merah
Tannin	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	Warna biru tua atau hijau kehitaman
Kumarin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Fluoresensi hijau atau biru
Fenolik	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	+	++	Warna hijau, merah ungu, biru atau hitam yang kuat

Ket : A = ekstrak pelepah kelapa sawit fermentasi dengan feses ayam
 B = ekstrak pelepah kelapa sawit fermentasi dengan feses sapi
 C = ekstrak pelepah kelapa sawit fermentasi dengan urea
 D = ekstrak pelepah kelapa sawit fermentasi dengan molases
 - tidak ada senyawa bioaktif
 + ada dalam jumlah sedikit
 ++ ada dalam jumlah cukup

Hasil analisis fitokimia (Tabel 5) memperlihatkan semua perlakuan yaitu pelepah kelapa sawit fermentasi dengan sumber inokulum yang tidak sama (feses ayam, feses sapi, urea dan molases) yang diekstraksi dengan n heksan dan etil asetat menunjukkan adanya senyawa steroid dalam jumlah sedikit (+). Tingkat kepolaran yang semakin tinggi maka senyawa yang diekstraksi semakin banyak. Penggunaan pelarut polar (methanol) pada proses ekstraksi mampu melarutkan senyawa dengan jenis yang lebih banyak yaitu ditemukan senyawa steroid dan tannin dalam jumlah sedikit (+) dan fenolik dalam jumlah cukup (++) dibandingkan senyawa non polar (n heksan) dan semi polar (etil asetat).

Proses ekstraksi menggunakan senyawa methanol pada pelepah kelapa sawit yang difermentasi menggunakan feses ayam dan urea mengandung senyawa tannin dan fenolik dalam jumlah sedikit (+). Senyawa fenolik dalam jumlah cukup

(++) ditemukan pada pelepah kelapa sawit yang difermentasi menggunakan feses sapi dan molasses.

Ekstrak n heksan dari pelepah kelapa sawit yang difermentasi dengan penambahan feses ayam menghasilkan rendemen terendah (0,78%) dibandingkan penambahan sumber inokulum lainnya dan ekstrak methanol menghasilkan rendemen tertinggi (7,87%). Hal ini menunjukkan ekstrak fermentasi pelepah kelapa sawit dengan sumber inokulum feses ayam mengandung senyawa polar (methanol) yang lebih besar dibandingkan senyawa non polar (n heksan). Analisis senyawa fitokimia memperlihatkan ekstrak methanol pelepah kelapa sawit yang difermentasi dengan penambahan feses ayam mengandung senyawa bioaktif steroid, tannin dalam jumlah sedikit (+) dan senyawa fenolik dalam jumlah cukup (++).

4.4.1 Steroid

Steroid merupakan golongan triterpena yang tersusun atas sistem cincin *cyclopentana perhydrophenanthrene*. Menurut Harbone (1998) steroid hanya terdapat pada hewan saja karena berfungsi sebagai hormon adrenal dan hormon seks tapi belakangan steroid ditemukan juga pada tumbuhan. Steroid yang terdeteksi pada ekstrak methanol, etil asetat dan n heksan pelepah kelapa sawit yang difermentasi menggunakan feses ayam diduga merupakan hormon adrenal dan hormon seks. Hal ini disebabkan pada ternak unggas sisa metabolisme yang tidak dapat dimanfaatkan lagi dikeluarkan dalam bentuk ekskreta melalui kloaka. Ekskreta terdiri dari feses, urin dan sperma/sel telur.

Terdapatnya senyawa steroid pada ekstrak methanol, etil asetat dan n heksan pelepah kelapa sawit yang difermentasi menggunakan feses sapi juga diduga merupakan hormone adrenal dan hormone seks karena feses yang dikeluarkan oleh ternak ruminansia merupakan sisa dari proses metabolisme zat makanan (protein, lemak dan karbohidrat). Hal yang sama dilaporkan Susanto (2010) senyawa steroid terdeteksi pada ekstrak methanol keong emas; dan *Achatina fulica* (Gastropoda air tawar seperti keong mas) (Bose *et al.*,1997). Steroid diduga memiliki efek peningkat stamina tubuh (aprodisiaka) dan anti-inflamasi,

seperti yang dilaporkan Silva *et al.* (2002) ekstrak daun *Agave attenuate* mengandung senyawa steroid yang memiliki aktivitas antiinflamasi.

Hasil pengujian fitokimia menunjukkan senyawa bioaktif steroid terdeteksi pada ketiga ekstrak pelepah kelapa sawit fermentasi (n heksan, etil asetat dan methanol) yang mempunyai polaritas berbeda. Harbone (1998) menyatakan steroid adalah kolesterol yang bersifat non polar sehingga larut pada n heksan (pelarut non polar,), etil asetat (semi polar) dan methanol (polar) dalam jumlah sedikit (+). Kandungan steroid pada daging sapi yang diekstrak menggunakan senyawa polar dan non polar tidak menunjukkan perbedaan (Schmidt dan Steinhart, 2001).

Ekstrak pelepah kelapa sawit fermentasi yang mengandung senyawa bioaktif steroid dapat dimanfaatkan sebagai antimikroba, karena berfungsi sebagai anti jamur. Triterpenoid dan steroid berfungsi sebagai antijamur (Lutfiyanti dkk. 2012). Senyawa bioaktif steroid dari ekstrak n heksan biji teratai menghambat pertumbuhan *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus agalactiae* dan *Saprolegnia sp* (Widya *et al.*, 2014).

4.4.2 Tannin

Ekstrak methanol pelepah kelapa sawit yang difermentasi menggunakan feses ayam dan diamoniasi menggunakan urea mengandung senyawa tannin dalam jumlah sedikit (+). Ekstrak methanol daun kelapa sawit dan ekstrak etanol pelepah kelapa sawit mengandung senyawa tannin (Sasidharan, 2010; Febrina dan Handoko, 2016).

Kandungan tannin pada ekstrak methanol pelepah kelapa sawit yang difermentasi menggunakan feses ayam dan diamoniasi menggunakan urea menunjukkan pelepah kelapa sawit berpotensi sebagai antimikroba. Tanin bersifat antibakteri dengan cara mengendapkan protein (Martono dan Setiyono, 2014), menginaktifkan enzim dan fungsi materi genetik (Masduki, 1996), menghambat pertumbuhan sel (Ajijah, 2004). Senyawa tannin yang ditemukan pada ekstrak etanol pelepah kelapa sawit (Febrina dan Handoko, 2016) dan kulit buah manggis (Poeloengan dan Praptiwi, 2010) berpotensi sebagai antimikroba.

4.4.3 Fenolik

Hasil analisis fitokimia pada ekstrak metanol pelepah kelapa sawit fermentasi dengan feses sapi dan molases menunjukkan adanya senyawa bioaktif fenolik dalam jumlah cukup (++). Hal ini mengindikasikan bahwa ekstrak metanol pelepah kelapa sawit fermentasi dengan feses sapi dan molases dapat dimanfaatkan sebagai antimikroba.

Senyawa polifenol ditandai dengan cincin aromatis dengan gugus hiodroksil (satu atau dua gugus) (Harborne, 1998). Senyawa fenol sering digunakan sebagai antibakteri (Ikalinus *et al* ., 2015). Perobahan permeabilitas membrane sitoplasma, pengendapan protein dan gangguan pertumbuhan merupakan mekanisme fenol sebagai anti bakteri (Ikalinus *et al* ., 2015). Daun Binahong yang diekstrak dengan etil asetat mengandung senyawa bioaktif polifenol dan saponin dengan mempunyai Konsentrasi Bunuh Minimum (KHM) terhadap *Shigella flexneri* adalah 8 % b /v (Wardani dan Sulistyani, 2012).

V. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

1. Pelepah kelapa sawit yang difermentasi dengan penambahan feses ayam menghasilkan nilai pH terendah (5,18), aroma asam (skor 3), warna hijau kekuningan (skor 3,03) dan tekstur lebih lunak (skor 2) serta kandungan lignin terendah (19,94%).
2. Ekstrak methanol pelepah kelapa sawit yang difermentasi menggunakan feses ayam menghasilkan ekstrak rendemen tertinggi (7,87%) dan mengandung senyawa bioaktif tannin dan fenolik dalam jumlah yang sedikit (+).
3. Ekstrak methanol pelepah kelapa sawit yang difermentasi menggunakan feses sapi dan molasses mengandung senyawa bioaktif fenolik dalam jumlah yang cukup (++).

5.2 Saran

Uji aktivitas antimikroba perlu dilakukan untuk mengetahui zona hambat pertumbuhan bakteri dan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM).

DAFTAR PUSTAKA

- Ajijah, A. 2004. Sensitivitas *Salmonella thyphimurium* terhadap ekstrak daun *Psidium guajava* L. Bioscience, 1(1), 31-8.
- Anonim 2009. Urea. www.pupukkaltim.com.
- Biyatmoko, D. 2013. Respons peningkatan nutrisi pelepah sawit fermentasi yang diinokulasi dengan inokulum yang berbeda. Ziraa'ah. 36(1):20-24.
- Bose R, Majumdar C, Bhattacharya S. 1997. Steroids in *Achatina fulica* (Bowdich): steroid profile in haemolymph and in vitro release of steroids from endogenous precursors by ovotestis and albumen gland. Comp Biochem Physiol 116C(3):179-182.
- Chong, K.H., Zuraina, Z., Sasidharan, S., Devi, P.V.K., Latha, L.Y., Ramanathan, S. 2008. Antimicrobial Activity of *Elaeis guineensis* Leaf, *Pharmacology online*. 3.379-386.
- Depkes RI. 2008. Farmakope Herbal Indonesia. Edisi 1. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Hal. 8-9, 11-12.
- Febriani. N. W. 2014. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol dan Fraksi-Fraksi dari Ekstrak Etanol Daun Kelapa Sawit (*Elaeis guineensis* Jacq) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Bacillus subtilis* serta profil KLT nya. Skripsi. Fakultas Farmasi. Universitas Muhammadiyah. Surakarta.
- Febrina. D, N. Jamarun., M. Zain and Khasrad. 2017. Effects of Using Different Levels of Oil Palm Fronds (FOPFS) Fermented with *Phanerochaete chrysosporium* plus Minerals (P, S and Mg) Instead of Napier Grass on Nutrient Consumption and the Growth Performance of Goats. Pakistan Journal of Nutrition. 16(8).612-617
- Febrina, D., N. Jamarun, M. Zain and Khasrad, 2016a. The effects of P, S and Mg supplementation of oil palm fronds fermented by *Phanerochaete chrysosporium* on rumen fluid characteristics and microbial protein synthesis. Pakistan Journal of Nutrition.15:299-304.
- Febrina, D., N. Jamarun, M. Zain and Khasrad, 2016b. Effects of calcium (Ca) and manganese (Mn) supplementation during oil palm frond fermentation by *Phanerochaete chrysosporium* on in vitro digestibility and rumen fluid characteristics. Pakistan Journal of Nutrition. 15: 352-358.
- Febrina, D dan J. Handoko. 2016. Ekstraksi dan Identifikasi Senyawa Antimikroba yang Berasal dari Pelepah Kelapa Sawit (*elaeis guineensis* jacq) sebagai Antibiotik Alami. Laporan Penelitian. Lembaga Penelitian Dan Pengabdian Kepada Masyarakat. Universitas Islam Negeri Sultan Syarif Kasim Riau. Pekanbaru.

- Febrina. D. 2016. Pemanfaatan Hasil Biodelignifikasi Pelepah Sawit Menggunakan Kapang *Phanerochaete chrysosporium* sebagai Pengganti Hijauan Pakan pada Ternak Kambing. Disertasi. Fakultas Peternakan Universitas Andalas. Padang.
- Febrina. D., S. I. Zam dan A. Fatah. 2011. Isolasi dan Identifikasi Bakteri yang Berperan dalam Proses Fermentasi Menggunakan Feses Sapi pada Ransum Berbahan Limbah Perkebunan Kelapa Sawit. Proceeding 2nd National Conference on Green Technology Eco-Technology for Sustainable Living. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim. Malang.
- Foss Analytical. 2006. Fibertec[™] M.6 1020 / 1021. User Manual 1000 1537 / Rev 3. Foos Analytical A.B. Sweden.
- Franswort, N. R. 1996. Biological and Phytochemical Screenings of Plant. *J. Pharm. Sci.*, 55 (3): 225-265.
- Hamzah. F dan N. Hamzah. 2012. Fraksi bioaktif pelepah kelapa sawit (*elaies guineensis* jacq.) pada beberapa bakteri dan jamur patogen. *Agriplus*.22(1):1-7.
- Harborne.A. J. 1998. Phytochemical Methods A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis. Edition Number 3. Springer Netherlands Number of Pages XIV, 302
- Ikalinus. R., S. K. Widyastuti dan Ni. L. E. Setiasih. 2015. Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Kulit Batang Kelor (*Moringa oleifera*). *Indonesia Medicus Veterinus*. 4(1):71-79.
- Imsya. A. 2006. Level Penggunaan Urea dalam Amoniasi Pelepah Sawit terhadap Kandungan Bahan Kering, Protein Kasar dan Neutral Detergent Fiber (NDF) dan Acid Detergent Fiber (ADF). Prosiding Seminar Hasil-hasil Penelitian Fakultas Pertanian Universitas Sriwijaya. Palembang. 226-234.
- Irvin, T.T. 1985. Wound healing. *Arch. Emerg. Med.* 2. 3-10.
- Jaelani. A., N. Widaningsih E. Mindarto. 2015. Pengaruh Lama Penyimpanan Hasil Fermentasi Pelepah Sawit oleh *Trichoderma Sp* terhadap Derajat Keasaman (pH), Kandungan Protein Kasar dan Serat Kasar. *Ziraa'ah*. 40(3):232-240.
- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 2005. Mikrobiologi Kedokteran. Diterjemahkan oleh Mudihardi. E., Kuntaman., Wasito. E. B., Mertaniasih N. M., Harsono. S., Alimsardjono. L. Edisi XXII. Penerbit Salemba Medika. Jakarta. 327-335.
- Junaidi. A. 2010. Analisis Kandungan Gizi Ransum Komplit dari Limbah Perkebunan Kelapa Sawit yang Difermentasi dengan Feses Sapi. Skripsi. Fakultas Pertanian dan Peternakan. Universitas Islam Negeri Sultan Syarif Kasim Riau. Pekanbaru.

- Khopkar, S. M. 1990. Konsep Dasar Kimia Analitik. Ed. Ke1. Terjemahan A. Saptorahardjo. UI- Press. Jakarta.
- Laura, B and G. Paolo. 2006. Algae. Anatomy Biochemistry and Biotechnology. CRC Press. Boca Raton. New York.
- Martono, B dan R. T. Setiyono. 2014. Skrining Fitokimia Enam Genotipe Teh J. TIDP 1(2), 63-68.
- Masduki, I. 1996. Efek antibakteri ekstrak biji pinang (*Areca catechu*) terhadap *S. aureus* dan *E. coli*. Cermin Dunia Kedokteran, 109, 21-4.
- Mucra, D.A. 2007. Pengaruh Fermentasi Serat Buah Kelapa Sawit terhadap Komposisi Kimia dan Kecernaan Nutrient secara *In-Vitro*. Tesis Pasca Sarjana Peternakan. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Naufalin R, Herastuti. 2012. Pengawet Alami pada Produk Pangan. UPT Percetakan dan Penerbitan Unsoed : Purwokerto.
- Nyananyo, B.I., Mensah, S.I., Achama, C. 2010. Phytochemical Investigations of Some Tropical Plants from The Niger Delta Area of Nigeria. *Scientia Africana*. 9(1).173-177.
- Nychas GJE, Tassou CC. 2000. *Traditional Preservatives-Oils and Spices*. Dalam : *Encyclopedia of Food Microbiology*. Robinson R, Batt C, Patel P (eds). Academic Press: London.
- Ohkuma, M., Yoshima M., Toru J and Toshiaki. K. 2001. Lignin degradations and role of white rot fungi : study of an efficient symbiotic system in fungus growing termites and its application to bioremediation. RIKEN. Rev 42:39-42.
- Pelczar MJ, Chan ECS. 1988 *Dasar-dasar Mikrobiologi 2*. Diterjemahkan oleh Hadioetomo RS, Imas T, Tjitrosomo SS, Angka SL. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta hal. 489-522.
- Perez, J., J. Munoz Dorado, T. de la Rubia, and Martinez. 2002. Biodegradation and-Biological Treatment of Cellulosa, Hemicellulosa and Lignin: an overview. *Int. microbiol*. 5: 53-56
- Prabowo. A., A. E. Susanti dan J. Karman. 2013. Pengaruh Penambahan Bakteri Asam Laktat terhadap pH dan Penampilan Fisik Silase Jerami Kacang Tanah. Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. 495-499.
- Puspitasari, F., F. Fathul dan S. Tantalo. Pengaruh Dosis Urea dalam Amoniasi Daun Nenas Varietas *Smooth Cayene* terhadap Kadar Bahan Kering, Abu, dan Serat Kasar. Jurnal Ilmiah Peternakan Terpadu.2(3).53-61.
- Rahayu. W. P. 2000. Aktivitas Antimikroba Bumbu Masakan Tradisional hasil Olahan Industri terhadap Bakteri Patogen dan Perusak. Buletin Teknologi dan Industri Pangan. 11(2) :42-48.
- Rahmatini, 2016. Senyawa Antimikroba. Makalah. Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas. Padang.

- Ridwan. R., S. Ratnakomala., G. Kartina dan Y. Widyastuti. 2005. Pengaruh Penambahan Dedak Padi dan *Lactobacillus plantarum* IBL2 dalam Pembuatan Silase Rumput Gajah (*Pennisetum purpureum*). Media Peternakan. 28(3).117-123.
- Rowe, R. C., P. J. Shekey, and M. E. Quinn. 2009. Handbook of Pharmaceutical Excipients Sixth Edition. USA: Pharmaceutical Press and American Pharmacist Association.
- Rusmiati, D., Sulistianingsih., T. Milanda., dan T. Rostinawati. 2011. Penuntun Praktikum Mikrobiologi Farmasi. Universitas Padjadjaran. Bandung.
- Saidi. M., Hadadji and B. Guessas. 2011. Screening of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria Isolated from West Algerian Goat's Milk. Global Journal of Biotechnology & Biochemistry 6 (3): 154-161,
- Salamah E., E. Ayuningrat dan S. Purwaningsih S. 2008. Penapisan awal komponen bioaktif dari kijang taiwan (*Anadonta woodiana* Lea.) sebagai senyawa antioksidan. *Buletin Teknologi Hasil Perikanan* 11(2):119-132.
- Sasidharan, S., Sharmini, R., Vijayarathna, S., Yoga Latha, L., Vijenth, R., Amala, R., Amutha, S. 2009. Antioxidant and hepatoprotective activity of methanolic extracts of *Elaeis guineensis* Jacq leaf. *Pharmacologyonline*. 3.84-90
- Sasidharan. S., Rajoo. N. Rathinam. X., Lachimanan. Y.L., and Rajoo. A. 2010. Wound Healing Potential of *Elaeis guineensis* Jacq Leaves in an Infected Albino Rat Model. *Molecules*. 15.3186-3199.
- Saun, R.J.V, & A.J. Henrich. 2008. Trouble shooting silage problem: How to identify potential problem. In: Proceedings of the Mid-Atlantic Conference: Pennsylvania, 26 May 2008. Penn State's Collage. Hlm 2-10.
- Schmidt G and H. Steinhart H. 2001. Impact of extraction solvents on steroid contents determined in beef. *Journal of Food Chemistry* 76:83-88.
- Setiabudi.1995. Pengantar Antimikroba. Gaya Baru. Jakarta
- Silva BP, Sousa AC, Silva GM, Mendes TP, Parente JP. 2002. A new bioactive steroidal saponin from *Agave attenuata*. *Z Naturforsch* 57C:423-428.
- Singgih. M. 2007. Uji pootensi antibiotik.
<http://digilib.si.itb.ac.id/go.php?id=jbptitbpp-gdl-s2-1990-sudding-1734>
- Steel, R. G. D dan J. H. Torrie. 2002. Prinsip dan Prosedur Statistika Suatu Pendekatan Biometrik. Terjemahan : M. Syah. Gramedia. Pustaka Umum. Jakarta.
- Suharyadi. 2012. Studi Penumbuhan dan Produksi Cacing Sutra (*Tubifex* sp.) dengan Pupuk yang Berbeda dalam Sistem Resirkulasi.[Thesis]. Universitas Terbuka. 116 hlm
- Suryani. N. C., D. G. M. Permana., A.A.G.N A.Jambe. 2016. Pengaruh Jenis Pelarut terhadap Kandungan Total Flavanoid dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Matoa (*Pometia pinnata*). *Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan*. 5(1):1-10.

- Suryanto, E. dan F. Wehantouw. 2009. Aktivitas Penangkapan Radikal Bebas dari Ekstrak Fenolik Daun Sukun (*Artocarpus altilis F.*). Chem. Prog.2(1):1-7.
- Susanti. A. D., D. Ardiana., G. Gumelar dan Y. Bening. 2012. Polaritas Pelarut sebagai Pertimbangan dalam Pemilihan Pelarut untuk Ekstraksi Minyak Bekatul dari Bekatul Varietas Ketan (*Oriza Sativa Glatinosa*). Simposium Nasional RAPI XI FT UMS. K8–K14.
- Susanto. I. G. 2010. Aktivitas Antioksidan dan Komponen Bioaktif Pada Keong Mas (*Pomacea canaliculata Lamarck*). Skripsi. Departemen Teknologi Hasil Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Suwandi, U.1992. Resistensi Mikroba terhadap Antibiotik. Jurnal *Cermin Dunia Kedokteran*. 74:46-49.
- Syahmi, A.R.M.; Vijayarathna, S.; Sasidharan, S.; Latha, L.Y.; Kwan, Y.P.; Lau, Y.L.; Shin, L.N.; Chen, Y. 2010. Acute oral toxicity and brine shrimp lethality of *Elaeis guineensis* jacq., (oil palm leaf) methanol extract. *Molecules*.15, 8111–8121.
- Tanu, I. 2009. *Farmakologi dan Terapi Edisi 5*. Universitas Indonesia. Jakarta.
- Tarmidi. A. R dan R. Hidayat. 2004. Peningkatan Kualitas Pakan Serat Ampas Tebu Melalui Fermentasi dengan Jamur Tiram Putih (*Pleurotus ostreatus*). Jurnal Bionatura. 6(2):197-204.
- Thompson, E. B. 1985. Drug Bioscreening. America: Graceway Publishing Company, Inc. Pp. 40, 118.
- Umiyasih. U dan E. Wina. 2008. Pengolahan dan Nilai Nutrisi Limbah Tanaman Jagung sebagai Pakan Ternak Ruminansia. Wartazoa. 18(3):127-136.
- USP Convention. 2008. United States of Pharmacopeia National Formulary, USP 30/ NF 25. Twinbrook Parkway: United States Pharmacopeial Convention.
- Vijayarathna, S., Zakaria, Z., Chen, Y., Latha, L.Y., Kanwar, J.R and Sasidharan, S., 2012, The Antimicrobial Efficacy of *Elaeis guineensis*: Characterization, In Vitro and In Vivo Studies, *Molecules*. 17:4860-4877
- Wardhani, L. K. dan N. Sulistyani. 2012. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Daun Binahong (*Anredera Scandens (L.) Moq.*) terhadap *Shigella Flexneri* Beserta Profil Kromatografi Lapis Tipis. Jurnal Ilmiah Kefarmasian. 2(1):1-16.
- Warly, L., Hermon, A. Kamaruddin, R.W.S. Ningrat dan Elihasridas. 1996. Pemanfaatan hasil ikutan agroindustri sebagai makanan ternak ruminansia. Laporan Penelitian Hibah Bersaing VA, Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi. Jakarta
- Widya. D. R., D. Suryanto dan Desrita. 2104. Aktivitas Antimikroba Biji Teratai (*Nymphaea pubescens L.*) terhadap Bakteri *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus agalactiae* dan Jamur *Saprolegnia sp.* Jurnal Aquacoastmarine. 2(1).7-14.

- Wikanastri. H., C. S. Utama dan A. Suyanto. 2012. Aplikasi Proses Fermentasi Kulit Singkong Menggunakan Starter Asal Limbah Kubis dan Sawi pada Pembuatan Pakan Ternak Berpotensi Probiotik. Seminar Hasil-hasil Penelitian. LPPM Universitas Muhammadiyah Semarang. Semarang.
- Wilkins, R. J. 1988. The Preservation of Forage. Elsevier Science Publisher BV, Amsterdam.
- Yudiastuti. S. O. N., Tensiska. Marsetio. 2007. Pengaruh Jenis Pelarut terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kasar Isoflavon dari Ampas Tahu. Jurnal Teknotan. 1(3).
- Zain. M., Erpomen dan Kartini. 2007. Amoniasi Daun Kelapa Sawit dengan Beberapa Taraf Urea dan Pengaruhnya terhadap Kandungan Gizi dan Kecernaan secara *In Vitro*. Jurnal Peternakan Indonesia. 12(3):195-200.